

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 114227

(P2003 - 114227A)

(43)公開日 平成15年4月18日 (2003.4.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	J 4 H 0 4 5 S
C 0 7 K 16/14		C 0 7 K 16/14	
G 0 1 N 33/536		G 0 1 N 33/536	A
// G 0 1 N 33/02		33/02	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 10数)			

(21)出願番号 特願2002 - 226040(P2002 - 226040)

(22)出願日 平成14年8月2日 (2002.8.2)

(31)優先権主張番号 01202941 - 9

(32)優先日 平成13年8月2日 (2001.8.2)

(33)優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71)出願人 598053215

ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッ
ド

RAN DOX L A B O R A T O R I E
S L T D .

イギリス、ノーザン・アイルランド、ピー
ティ29・4キューワイ、カウンティ・アント
リム、クラムリン、ダイヤモンド・ロード、
アードモア

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 - ラクタムペニシリンを検出、またはその量を決定するための方法およびキット

(57)【要約】

【課題】 牛乳および食肉中の、一般的な - ラクタム
抗生物質の迅速な検出方法を開発すること。

【解決手段】 本発明は、主な第1世代 - ラクタムに
わたる広範な特異性を有し、そして残留 - ラクタム抗
生物質の存在について牛乳および食肉などを試験するた
めに使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】置換型または非置換型フタルアルデヒド、置換型または非置換型イソフタルアルデヒド、および置換型または非置換型テレフタルアルデヒドからなる群から選択される置換型または非置換型フェニルジカルボアルデヒドと - アミノ基で架橋した6 - [D - - アミノアセトアミド] ペニシリン誘導体を含むハプテン。

【請求項2】フェニルジカルボアルデヒドが置換型または非置換型テレフタルアルデヒド、好ましくは非置換型テレフタルアルデヒドである、請求項1に記載のハプテン。

【請求項3】置換型または非置換型フェニルジカルボアルデヒドを6 - [D - - アミノアセトアミド] ペニシリン誘導体と適切な溶媒中で反応させることを含む、請求項1または2に記載のハプテンを製造する方法。

【請求項4】抗原性付与キャリア物質に連結された請求項1または2に記載のハプテンを含有する免疫原。

【請求項5】キャリア物質がタンパク質、タンパク質フラグメント、合成ポリペプチドまたは半合成ポリペプチドである、請求項4に記載の免疫原。

【請求項6】インタクトな - ラクタム環の少なくとも1つの構造エピトープと結合し得る、請求項4または5に記載の免疫原に対して惹起された抗体。

【請求項7】前記抗体が支持体に固定されている、請求項6に記載の抗体。

【請求項8】前記方法が、請求項4または5に記載の免疫原を反復投与することにより動物を免疫感作する工程、および免疫感作した動物から得られた血清抗体を回収する工程を含む、請求項6または7に記載の抗体の製造方法。

【請求項9】前記方法が血清抗体を支持体に固定することをさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】検出可能な標識物質に共有結合した請求項1または2に記載のハプテンを含む結合体。

【請求項11】前記標識物質が、好ましくはペルオキシダーゼ、最も好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼである酵素、好ましくは生物発光、化学発光または蛍光物質から選択される発光物質、放射活性物質あるいはそれらの混合物から選択される、請求項10に記載の結合体。

【請求項12】サンプルを請求項10または11に記載の結合体またはそれらの混合物と、および請求項6または7に記載の抗体またはそれらの混合物と接触させること、結合した結合体を検出またはそれらの量を決定すること、ならびにサンプル中の - ラクタムペニシリンの存在または量を校正曲線から演繹することを含む、サンプル中の - ラクタムペニシリンを検出あるいはその量を決定する方法。

【請求項13】 - ラクタムペニシリンを検出あるいは

はその量を決定するためのキットであって、請求項10または11に記載の結合体またはそれらの混合物および請求項6または7に記載の抗体またはそれらの混合物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 - ラクタムペニシリンを検出、またはその量を測定するための方法およびキット、ならびにそれに有用なハプテン、免疫原、結合体および抗体に関する。

【0002】「検出(する)」とは、基質の存在または非存在を定性的に分析することを意味する。

【0003】「測(決)定(する)」とは、基質の量を定量的に分析することを意味する。

【0004】本発明は、主な第1世代 - ラクタムペニシリン(例えば、アンピシリン、ペニシリンG、アモキシシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリンおよびオキサシリン)全般に広範な適用を有することを意図し、これらの特定の - ラクタムペニシリンに限定することを意図しない。

【0005】抗生物質は、動物管理において、予防的および治療的な目的の両方で日常的に使用されている。

- ラクタムクラスの抗生物質は、一般的に、食肉および乳業産業において成長促進剤として使用されている。ペニシリン類としても知られるこのクラスは、酪農牛の乳房炎を処置するために使用され、これにより牛乳の収量およびウシの生産寿命を上昇させる。また、 - ラクタムは、家禽およびブタの成長を促進するために動物の食餌中に含ませることができる。疾患予防を通じて、またはそのような動物の天然の消化管叢の活性を阻害することにより、抗生物質は、そのような促進剤を使用しない場合よりも早く動物を売買のできるサイズに到達させる。

【0006】しかしながら、 - ラクタムの残留物が食肉中および乳製品中に存在する場合に問題が生じ得る。抗生物質を用いる場合、ヒトが - ラクタムに連続的に暴露されることによる、病原性細菌の耐性株の発生に起因し、疾患の処置に使用される薬物の効力の減少が生じ得る。また、消費食物中に - ラクタムが存在することにより、ペニシリン感受性のヒトにおいてアレルギー性反応が生じ得る。また、これらの抗生物質を含有する乳製品は、加工の際に使用される細菌培養物を妨害しうる。

【0007】結果として、牛乳および食肉における - ラクタムの投与中止時期および最大残留基準値(MRL)に関して欧州共同体全体で厳格なガイドラインが課せられている。牛乳および食肉のサンプルは、それらをこのECの法律に確実に適合させるため、日常的に試験されている。 - ラクタムのような抗生物質について試験するために種々の方法が使用されている。これらの試

験の多くは、細菌阻害試験に基づいているが、これらは時間がかかり、そして個々のβ-ラクタムに対して特異的かもしれない。牛乳および食肉中のβ-ラクタムの迅速な検出方法の開発は、その方法が一般的、すなわち、全部でないにしても大多数のβ-ラクタム抗生物質を検出する方法であれば、特に価値があるだろう。

【0008】

【従来の技術】一般的なβ-ラクタムの検出のためのイムノアッセイを作製するために、β-ラクタム感作動物において抗体を惹起させるために多数の試みが行われている。このようなプロセスの第1段階は、動物宿主中において免疫応答を誘発する免疫原を作製することである。このことは、キャリアタンパク質への結合の間にβ-ラクタム環をインタクトなままで維持し得ないことが問題となっている。開環ラクタムに基づく公知の結合方法は、例えば、US-A-4,347,312、US-A-5,128,240中、de Haanら、1985中およびFaghihi Shiraziら、1991中に開示されている。これは開環形のβ-ラクタム環に対して感受性であり、必ずしも一般的な環構造に対して感受性でない抗血清の産生を生じるかもしれない。

【0009】あるいは、例えば、EP-A-309,299中およびUsleberら、1994に開示されているように、閉環β-ラクタムの遊離カルボキシル基をエステル化することができる。この様式で結合したβ-ラクタム抗生物質に対して惹起された抗血清はアシル側鎖に対して特異的であり、イソキサゾリルペニシリンの場合のように類似の側鎖を有する場合にのみ、他のβ-ラクタム抗生物質と交差反応する。さらに、別法では、

EP-A-309,299およびde Leuwら、1997に開示されているように、6-アミノペニシラン酸の6-アミノ基により結合させることができる。このような場合、β-ラクタム環が結合の間にインタクトなままであるならば、抗体は主な第1世代β-ラクタムと高い交差反応性を示す。β-ラクタムペニシリンについてのさらに可能性の高い結合部位は、例えば、Nagakuraら、1991に開示されるように、ペニシリンのD-β-アミノアセトアミド基のβ-アミノ基を介するものである。Nagakuraら、1991に開示される細胞株であるAbp4およびAbp7は、MBS(マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド)クロスリンカーを用いるハプテンおよび結合体に関するものであり、文献には、細胞株の内の1つ(Abp4)はチアゾリジン環を認識し、一方、細胞株の他方(Abp7)はアシル側鎖を認識すると結論付けている。Abp4は、ペニシリンG、6-アミノペニシラン酸および特定のセファロスポリンと交差反応し、他方、Abp7は非常に特異的であり、主な第1世代β-ラクタムとはほとんどまたは全く交差反応性を示さない。

【0010】

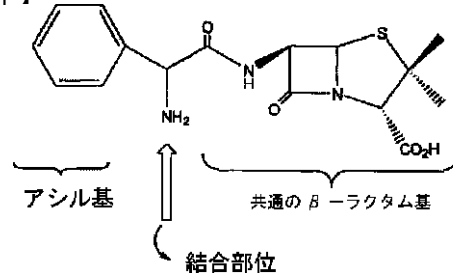
*【発明が解決しようとする課題】本発明は、免疫原を作製するための、ペニシリンのD-β-アミノアセトアミド基のβ-アミノ基で、抗原性付与キャリア物質へと結合した新規なハプテン(アンピシリン誘導体)の結合体を記載している。また、この免疫原に対して作製された抗体を一般的なアッセイの開発においてどのように使用するかも記載しており、これはβ-ラクタム抗生物質の存在について牛乳および食肉などを試験するために使用され得る。

【0011】

【課題を解決するための手段】第1の局面において、本発明は、β-アミノ基で置換型または非置換型フェニルジカルボアルデヒド(これは、置換型もしくは非置換型フタルアルデヒド、置換型もしくは非置換型イソフタルアルデヒドおよび置換型もしくは非置換型テレフタルアルデヒドからなる群から選択される)と架橋した6-[D-β-アミノアセトアミド]ペニシリン誘導体を含むハプテンを提供する。

【0012】代表的な6-[D-β-アミノアセトアミド]ペニシリン誘導体は、以下の構造式:

【化1】



を有する。結合部位は矢印によって示されている。

【0013】好ましくは、フェニルジカルボアルデヒドは置換型または非置換型テレフタルアルデヒドであり、最も好ましくは非置換型テレフタルアルデヒドである。適切な置換としては、アルデヒド、チオイソシアネートおよびN-ヒドロキシスクシンイミド官能基のパラ-およびオルト位での付加が挙げられる。

【0014】ハプテンは、適切な溶媒(なかでも、ジメチルホルムアミドおよびジメチルスルホキシドは適切な例である)中で置換型または非置換型フェニルジカルボアルデヒドを6-[D-β-アミノアセトアミド]ペニシリン誘導体と反応させることにより製造される。

【0015】さらなる局面において、本発明は、抗原性付与キャリア物質に結合した本発明のハプテンを含む免疫原に関する。好ましくは、キャリア物質はタンパク質、タンパク質フラグメント、合成ポリペプチドまたは半合成ポリペプチドである。

【0016】なおさらなる局面において、本発明は本発明の免疫原に対して惹起された抗体に関し、この抗体はインタクトなβ-ラクタム環の少なくとも1つの構造エピトープと結合することができる。好ましくは、抗体は

支持体上に固定される。

【0017】さらに、本発明は、抗体を製造するプロセスを提供し、このプロセスは、本発明の免疫原を反復投与することにより動物（好ましくは脊椎動物、最も好ましくは哺乳動物）を免疫感作すること、および免疫感作した動物から得られた血清抗体を回収することを含む。好ましくは、このプロセスはさらに、前記の血清抗体を支持体（好ましくは、固体支持体、最も好ましくはポリスチレン固体支持体）に固定することを含む。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体である。あるいは、抗体はモノクローナル抗体である。

【0018】なおさらなる局面において、本発明は検出用標識物質に共有結合した本発明のハプテンを含む結合体に関する。好ましくは、標識物質は、酵素、発光物質、放射性基質またはそれらの混合物から選択される。好ましくは、標識物質は酵素であり、好ましくはペルオキシダーゼであり、最も好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である。あるいは、またはさらには、蛍光物質は生物発光、化学発光または蛍光物質であり得る。

【0019】なおさらなる局面において、本発明はサンプル中の β -ラクタムペニシリンを検出、またはその量を決定する方法に関し、この方法はサンプルを、本発明の結合体またはその混合物、および本発明の抗体またはその混合物と接触させること、結合した結合体を検出またはその量を決定（測）定すること、校正曲線からサンプル中の β -ラクタムペニシリンの存在または量を導くことを含む。

【0020】好ましくは、抗体はポリクローナルである。

【0021】さらなる局面において、本発明は β -ラクタムペニシリンを検出またはその量を決定するためのキットに関し、このキットは本発明の結合体またはその混合物、および本発明の抗体またはその混合物を含む。このキットは、必要に応じて、サンプル中の β -ラクタムペニシリンを検出またはその量を決定するための結合体*

*および抗体の使用に関する使用説明書を含んでいてもよい。

【0022】好ましくは、サンプルは生物学的流体（牛乳を含む）のような溶液または食肉のような細胞組織断片である。

【0023】本発明の方法およびキットにおいて、 β -アミノ位で架橋した（免疫原および結合体の）各クロスリンカーは、同一または異なっているもよい。

【0024】さらなる局面において、本発明は、 β -ラクタム抗生物質の検出またはその量の測定のために牛乳および食肉のようなサンプルを試験するために、本発明の結合体またはそれらの混合物を、本発明の抗体またはそれらの混合物とともに使用することに関する。

【0025】本発明は、従来の抗原性付与キャリア物質への結合により、新規な免疫原の製造の際に使用される新規なハプテンに関する。次いで、得られた免疫原は動物（好ましくは脊椎動物宿主、最も好ましくは哺乳動物宿主）に投与され、次に、結合体（ハプテン - 標識薬剤）またはその混合物を検出薬剤として使用する、 β -ラクタムペニシリンに関する一般的なイムノアッセイを開発するために使用される、強力な（avid）ポリクローナル抗血清の産生を誘発する。

【0026】アンピシリンおよび他の β -ラクタムペニシリンの化学構造を、以下の構造式について以下の表にまとめる。

【0027】

【化2】

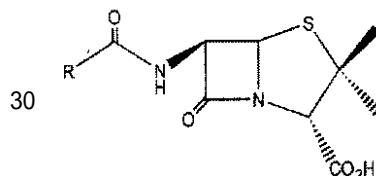


表1： β -ラクタムペニシリンの化学構造

【表1】

ペニシリン	R
ペニシリンG	PhCH ₂ CO
ペニシリンV	PhOCH ₂ CO
アンピシリン	D-PhCH(NH ₂)CO
アモキシリン	D-(p-ヒドロキシ)PhCH(NH ₂)CO
オキサシリン	5-メチル-3-フェニル-4-イソキサゾリル-カルボニル
クロキサシリン	5-メチル-3-(O-クロロフェニル)-4-イソキサゾリル-カルボニル
ジクロキサシリン	5-メチル-3-(O, O'-ジクロロフェニル)-4-イソキサゾリル-カルボニル
6-アミノペニシラン酸	H

【0028】本発明の目的は、 β -ラクタムペニシリングループ全体に対して特異的な抗体の製造である。この広い特異性を達成するために、アンピシリンを置換型もしくは非置換型フェニルジカルボアルデヒド、好ましくは置換型もしくは非置換型テレフタルアルデヒド（非置換型テレフタルアルデヒドを添付の図面の図1に示す）のような二官能性クロスリンカーを用いてアミノ基を介して誘導体化する。アンピシリンの β -ラクタム環を、ペニシリングループに共通のエピトープが確実に保持されるように誘導体化の間、保護する。

【0029】本発明のハプテン（アンピシリン誘導体）は規定の構造エピトープを提供するが、それ自体は免疫原性ではなく、それゆえ、適切な免疫原性付与キャリア物質に連結されねばならず、その結果、作製された免疫原が、宿主動物へと注射された場合に免疫原性応答を誘発する。適切な免疫原性付与キャリア物質としては、アルブミン、グロブリンのような血清タンパク質、眼レンズタンパク質（ocular lens protein）およびリポプロテインのようなタンパク質およびタンパク質フラグメントが挙げられる。例示的なタンパク質キャリアとしては、ウシ血清アルブミン、卵オボアルブミン、ウシグロブリン、チロキシン結合グロブリン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが挙げられる。あるいは、反応性官能基を保有する、他の合成または天然のポリマー物質の場合、リジンのような十分な数の利用可能なアミン基を有する合成ポリ（アミノ酸）が使用され得る。特に、炭水化物、イーストまたは多糖類をハプテンへと結合させて本発明の免疫原を作製することができる。

【0030】また、ハプテン（アンピシリン誘導体）を酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、蛍光物質または放射活性物質のような標識薬剤へと結合させてイムノアッセイでの使用のための検出試薬を作製する。蛍光物質は、例えば、フルオレセインまたはその誘導体の一価の残基であり得る。

【0031】ハプテン、およびキャリア物質または標識物質（例えば、酵素または他の標識）のいずれかとのその結合体の製造は、図1に記載の反応式にしたがって行われる。すなわち、例えば、アンピシリンをジメチルホルムアミド中で室温で18時間、テレフタルアルデヒドと反応させてシッフ塩基中間体を作製する。中間体を、キャリア物質（例えば、ウシ血清アルブミン）または標識薬剤（例えば酵素または標識）のいずれかと酢酸緩衝液（pH4~5）中で反応させ、続いて、例えば、シアノホウ化水素ナトリウムを用いるシッフ塩基の還元により、それぞれ、本発明の免疫原または本発明の結合体のいずれかを得る。

【0032】キャリア物質に対するハプテンの適切な結合が達成されていることを確認するために、免疫感作の前に各免疫原をマトリックス支援UVレーザー脱離/イオン化質量分析（MALDI MS）を用いて評価する。好ましいキャリア物質であるウシ血清アルブミンの場合、キャリア分子1つあたり最小6分子のハプテンが好ましい。

【0033】ポリクローナル抗血清を作製するために、免疫原をフロイントアジュバントと混合し、この混合物を宿主動物（例えば、ウサギ、ヒツジ、マウス、モルモットまたはウマ）に注射する。さらに注射（追加免疫）を行い、抗体力価の評価のために血清をサンプリングする。最適な力価に達していた場合、次いで、宿主動物を放血させて適切な量の特異抗血清を得る。必要とされる抗体精製の程度は、意図される適用に依存する。多くの目的には、精製は全く必要ではないが、しかし、固体支持体上に抗体が固定されるような場合では、望ましくない物質を取り除き、そして非特異的な結合を減少または排除するために精製工程が採用される。

【0034】アンピシリンに対して作製された抗体は、牛乳のような生物学的流体中、および食肉のような食品中の β -ラクタムペニシリンの存在を決定するための生化学アッセイにおける試薬として有用である。

【0035】

【実施例】実施例1

ハプテン の製造

テトラフルアルデヒド(183mg、1.364mmol)を、アンピシリントリヒドレートのジメチルホルムアミド溶液(500mg、1.24mmol)10mlに、窒素下で20℃で添加した。混合物を光から保護し、24時間、室温で攪拌した。反応が完了したことを確認するために、薄層クロマトグラフィー(TLC)(80%クロロホルム、20%メタノール v/v)を行った。その結果、これは残存開始物質を示さず、アンピシリンよりも極性の低い、新規なスポットの形成が示された。ハプテン溶液は窒素下で、-20℃で保存した(1年間安定)。

【0036】実施例2

免疫原(ハプテン-ウシ血清アルブミン)の製造

実施例1で製造したハプテン溶液を、ウシ血清アルブミン(200mg)の0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.1)溶液10mlに滴下した。混合物を光から保護し、室温で4時間攪拌した。シアノホウ化水素ナトリウム30mgを添加することにより、シッフ塩基の還元を達成した。混合物を90分間攪拌し、ホウ化水素ナトリウム5mgを添加した。さらに10分間攪拌した後、混合物をリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.2)に対して4℃で24時間透析した(3回交換)。ハプテン対BSAの結合の程度をMALDI MSで評価すると、BSA1分子に対してハプテン6.3分子の結合比を示した。

【0037】実施例3

結合体(ハプテン-HRP)の製造

実施例1のハプテンのHRPへの結合は、免疫原の製造についての記載と同様に行った。実施例1で製造したハプテン溶液(40μl)を、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4~5)0.2ml中のHRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)20mgに添加した。混合物を光から保護し、室温で4時間攪拌した。シアノホウ化水素ナトリウム(0.7mg)を添加し、混合物を90分攪拌した。2本のPD-10カラム(Pharmacia Biotech)を用いて結合体を精製し、一晩、光から保護して脱イオン水に対して2回(against double deionised water)、2~8℃で透析した。

【0038】実施例4

実施例2の免疫原に対して惹起された抗体の製造

実施例2の免疫原の水溶液をフロイント完全アジュバント(FCA)とともに調製して50%(v/v)FCA中2mg/mlの免疫原からなる乳液を形成した。この乳液を用いて、各動物のわき腹にそれぞれ4カ所、0.25ml皮下注射して、3匹のヒツジを免疫感作した。続いての免疫感作(追加免疫)は50%(v/v)フロ

イント不完全アジュバント(FIA)中に乳化させた免疫原1mg/mlを含んでおり、1年間の間、1ヶ月の間隔で、同様の方法で投与した。各追加免疫の7~14日後に血液サンプリングを行った。各サンプルを処理して抗血清を作製し、これを、カプリル酸および硫酸アンモニウム沈殿によりさらに精製して免疫グロブリンG(IgG)画分を得た。以下に記載の競合ELISAマイクロタイタープレートアッセイによりIgG画分を評価した。

【0039】実施例5

競合ELISAの開発

チェッカー盤力価測定(checkerboard titration)を行って最適な捕獲抗体および結合体(アンピシリン-HRP)の濃度を決定した。(実施例4に従って製造した)試験する各抗血清のIgG画分の段階希釈を10mM Tris(pH8.5)中で製造した。エンハンスドバインド(enhanced binding)96ウェルポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルを、37℃で2時間インキュベートすることによりこれらの希釈物でコーティングした(125μl/ウェル)(図2に示す)。プレートを、Tween(商標)20(TBST)を含むTris緩衝化生理食塩水(pH7.4)で4回洗浄し、軽くたたいて乾燥させた。アンピシリンのTBST溶液(10ng/ml)50μl(midアッセイ範囲)を適切なウェルに添加した(図2)。TBST50μlを残りの(コントロール)ウェルに添加した。結合体(アンピシリン-HRP)の系列希釈を、EDTA、D-マンニトール、スクロース、チメロサルおよびBSAを含むTris緩衝液(pH7.2)中に調製し、各希釈物75μlを図2に示すようにウェルに添加した。プレートを37℃で2時間インキュベートした。10分間にわたり、TBSTを用いて6回洗浄することにより過剰の非結合型結合体を取り除いた。テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液125μlをプレートの各ウェルに添加し、次いで、暗所にて室温で15~20分インキュベートした。0.2M H₂SO₄125μlを各ウェルに添加することにより反応を終結させた。次いで、マイクロタイタープレートリーダーを用いて吸光度を450nmで測定した。1/1000の希釈の捕獲抗体を1/15000希釈の結合体と組合わせて許容範囲の最高吸光度2.15、および0~10ng/ml抗原濃度の間で80%の顕著な減少を生じた。

【0040】次いで、マイクロタイタープレートを、上記で概説したように、Tris(pH8.5)中1/1000の最適コーティング希釈での抗アンピシリン抗血清のIgG画分を用いてコーティングした。アンピシリン(ナトリウム塩)の標準溶液をTBST中で調製し、以下の濃度で適用した:0、1、5、10、50、100、200、500ng/ml。得られたデータによ

り、図3に示される高感度校正曲線を得た。ここで、Bはx ng/mlアンピシリンに対する450 nmで測定した吸光度であり、B₀は0 ng/mlアンピシリンに対する450 nmで測定した吸光度である。

【0041】実施例6

アンピシリンイムノアッセイの各β-ラクタムペニシリンとの交差反応性
ベンジルペニシリン(ペニシリンG - PenG)、アモキシシリン(AmoX)、クロキサシリン(CloX)、ジクロキサシリン(DicloX)およびオキサシリン(Oxa)の標準溶液を、TBST中0、1、5、10、50、100、200および500 ng/mlで調製した。各々のβ-ラクタムペニシリン標準をアンピシリンイムノアッセイに用いて校正曲線を作製し(図4)、これらを用いて各ペニシリンでのイムノアッセイの交差反応性を決定した。この研究の結果を図2に示す。交差反応性は、以下の式に従って計算した。

$$\%CR = IC50_{amp} / IC50_{pen} \times 100$$

[式中、%CRは交差反応性の割合であり、IC50_{amp}はシグナルの50%の置き換わりが生じるアンピシリンの濃度であり、IC50_{pen}はβ-ラクタムペニシリンの濃度である。ここで、シグナルの50%置き換わりが生じる%CRが算出される。]

アンピシリンイムノアッセイは各々のβ-ラクタムペニシリンと高いレベルの交差反応性を示した(表2)。高いレベルの交差反応性とは、アンピシリンに関して35%より高い交差反応性を意味する。本発明のイムノアッセイはアンピシリン(100%CR)、アモキシシリン(87%CR)およびベンジルペニシリン(72%CR)に対して最も特異的である。牛乳中のアモキシシリン、アンピシリンおよびベンジルペニシリンについての最大推奨濃度(MRL)は各々4 μg/kgであり、オキサシリン、シクロキサシリンおよびジシクロキサシリンは、各々30 μg/kgであるので、β-ラクタムペニシリンの各々について測定したIC50値は記載したELISAが、EC規則2377/90に従ってβ-ラクタム抗生物質に対する一般的なイムノアッセイとしての使用に適していることを示唆する。

【0042】表2：アンピシリンイムノアッセイのβ-ラクタムペニシリンとの交差反応性

【表2】

β-ラクタム	アッセイ 1		アッセイ 2		アッセイ 3		平均値結果		MRLs μg/kg
	IC50 ng/ml	%CR	IC50 ng/ml	%CR	IC50 ng/ml	%CR	IC50 ng/ml	%CR	
Amp	1.7	100	2.5	100	2.5	100	2.2	100	4
Amox	1.8	94	3.0	83	3.0	83	2.6	87	4
PenG	2.7	63	3.2	78	3.4	74	3.1	72	4
Oxa	4.0	42.5	7.0	36	6.6	38	5.9	39	30
Cloxa	3.4	50	5.8	43	5.8	43	5	45	30
Dicloxa	3.8	45	6.0	42	4.9	51	4.9	46	30

【0043】実施例7

一般的なイムノアッセイを用いる牛乳中のβ-ラクタム抗生物質の定性的分析
一定範囲の牛乳サンプルを、標準的な抗菌方法を用いてβ-ラクタム抗生物質の存在について試験した。次いで、割り当てられた値を有するこれらのサンプルを本発明のELISAを用いて試験した。実施例5に記載のように、マイクロタイタープレートにコーティングし、試薬を調製した。イムノアッセイ手順を以下のようにして適合させた。脱脂粉乳を蒸留水に溶解することにより牛乳緩衝液(pH7.4)の1%溶液を調製し、この緩衝液25 μlをプレートのウェルに添加した。牛乳緩衝液の添加に続いてアンピシリン標準を加え(1ウェルあたり25 μl)、続いて牛乳サンプル(1ウェルあたり25 μl)をロードした。標準およびサンプルの両方を2連で行った。次いで、結合体(アンピシリン-HRP)を添加し(1ウェルあたり75 μl)、マイクロタイタープレートを37℃で2時間、競合反応を生じさせるた

めにインキュベートした。競合反応の後、プレートを洗浄し、実施例5の記載と同様にして発色させた。分析の結果を表3に示す。これは、記載した一般的なβ-ラクタムELISAにより試験した一定範囲の牛乳サンプルについて算出した濃度を示す。記載したβ-ラクタムELISAを用いて、β-ラクタムの存在に関してネガティブであることがわかっている牛乳サンプル(サンプル1~6)を試験し、ならびにβ-ラクタムポジティブなサンプル(サンプル7および8)を確認した。ELISAの結果により、β-ラクタム抗生物質含量に関してはサンプル1~6がネガティブであること、ならびにサンプル7および8がポジティブであることが確認される(表3を参照のこと)。

【0044】表3に示すELISAの結果は、このイムノアッセイを用いてβ-ラクタムの存在に関して牛乳サンプルを良好にスクリーニングできることを証明している。ELISAにより試験したネガティブサンプルはネガティブであることが確認され、既知のポジティブサン

ブルはポジティブであることが確認された。

【0045】表3

牛乳サンプル	吸光度	CV%	算出した濃度 (ng/ml)
1	1.906	2.2	ネガティブ
2	1.826	1.7	ネガティブ
3	2.083	1.6	ネガティブ
4	1.857	0.1	ネガティブ
5	1.754	3.1	ネガティブ
6	1.719	0.9	ネガティブ
7	0.718	9.0	126.19
8	0.914	7.8	66.79

*【表3】

【0046】引用文献

Faghihi Shirazi M., Hung T V., Womersley DM. 1991. Polyclonal antibodies reactive to some Beta-Lactam antibiotics. Australian Journal of Dairy Technology, 46 (2), 88~90.

De Haan P., de Jonge A. J. R., Verbrugge T. および Boorsma D. M., 1985. Three epitopes specific monoclonal antibodies against the hapten penicillin. Int. Arch. Allergy Appl Immun. 76:42~46.

De Leuw P., Kapa G. および Petz M., 1997. Production and Characterisation of Multianalyte Antibodies against penicillins in egg yolk. J. of AOAC International 80(6):1220~8.

Nagakura N., Souma S., Shimizu T., Yanagihara Y., 1991. Anti-ampicillin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to various -lactams. J. of Antimicrobial Chemotherapy 28:357~368.

Usleber, E., Lorber, M., Straka M., Terplan G., Martlbauer E., 1994. Enzyme Immunoassay for the Detection of Isoxazolyl Penicillin Antibiotics in Milk. Analyst, 119, 2765-2768.

【0047】

【発明の効果】本発明は、置換型または非置換型フェルジカルボアルデヒドと -アミノ基で架橋した6-[D- -アミノアセトアミド]ペニシリン誘導体を含むハプテンを提供する。さらに、本発明は、抗原性付与キャリア物質に連結したハプテン、標識物質に結合した上記のハプテンを含む結合体を含む免疫原、ならびに上記の免疫原に対して惹起され、そしてインタクトな -ラクタム環の構造的エピトープの少なくとも1つと結合し得る抗体を提供する。本発明はさらに、 -ラクタム抗体を検出するため、またはその量を決定するための方法およびキット、ならびに -ラクタム抗体を検出またはその量を決定するための上記の抗体との結合体の使用を提供する。本発明は、主な第1世代 -ラクタムにわたる広範な特異性を有し、そして残存 -ラクタム抗生物質の存在について牛乳および食肉などを試験するために使用することができる。

【図面の簡単な説明】

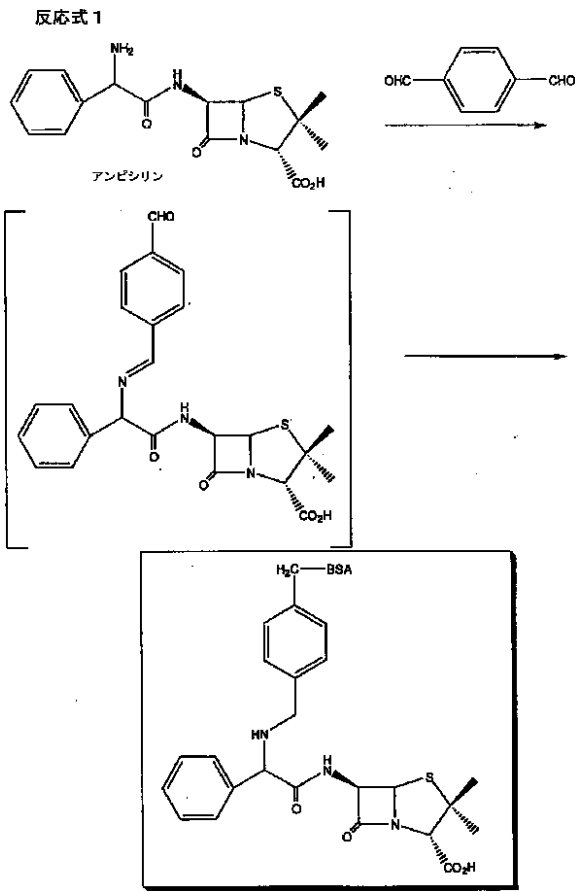
【図1】 図1は反応式1に関する。この反応式は、本発明の免疫原または本発明の結合体を形成するために、本発明のハプテンを製造し、続いてキャリア物質または標識薬剤のいずれかに結合させることに関する一般反応式である。

【図2】 図2は、マイクロタイタープレートでの競合ELISA力価アッセイの模式図である。

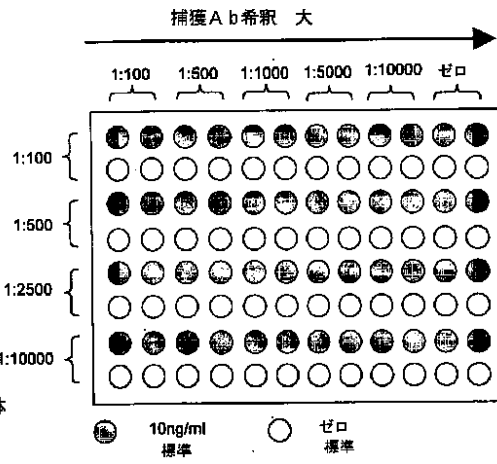
【図3】 図3は、競合ELISAの校正曲線である。

【図4】 図4は、ELISAにおける標準として各々の -ラクタムペニシリンを用いて作製した校正曲線である。

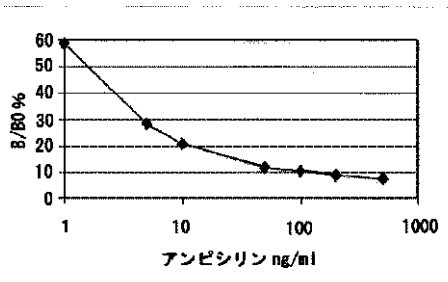
【図1】



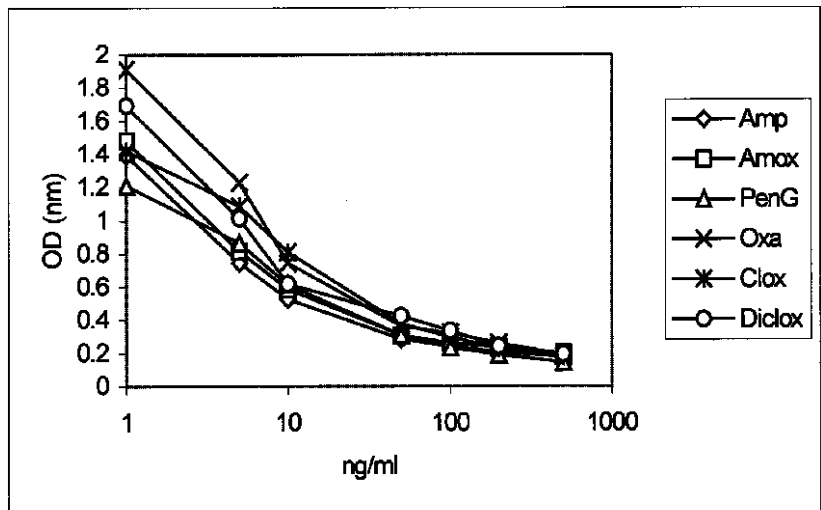
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 ロバート・アイバン・マッコネル
イギリス、ノーザン・アイルランド、ピー
ティ29・4キューワイ、カウンティ・アン
トリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロー
ド、アードモア、ランドックス・ラボラト
リーズ・リミテッド内

(72)発明者 エル・オアード・ベンチク
イギリス、ノーザン・アイルランド、ピー
ティ29・4キューワイ、カウンティ・アン
トリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロー
ド、アードモア、ランドックス・ラボラト
リーズ・リミテッド内

(72)発明者 スティーブン・ピーター・フィッツジェラ
ルド
イギリス、ノーザン・アイルランド、ピー
ティ29・4キューワイ、カウンティ・アン
トリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロー
ド、アードモア、ランドックス・ラボラト
リーズ・リミテッド内

(72)発明者 ジョン・ビクター・ラumont
イギリス、ノーザン・アイルランド、ピー
ティ29・4キューワイ、カウンティ・アン
トリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロー
ド、アードモア、ランドックス・ラボラト
リーズ・リミテッド内

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 CA15 DA75 EA50

FA71

专利名称(译)	用于检测或确定β-内酰胺青霉素的量的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2003114227A	公开(公告)日	2003-04-18
申请号	JP2002226040	申请日	2002-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
申请(专利权)人(译)	运行码头实验室有限公司		
[标]发明人	ロバートアイバンマッコネル エルオアードベンチク スティーブンピーターフィッツジェラルド ジョンビクターラumont		
发明人	ロバート・アイバン・マッコネル エル・オアード・ベンチク スティーブン・ピーター・フィッツジェラルド ジョン・ビクター・ラumont		
IPC分类号	G01N33/53 C07D499/00 C07D499/40 C07K16/14 C07K16/44 G01N33/02 G01N33/536 G01N33/94		
CPC分类号	C07D499/00 C07K16/44 G01N33/9446 G01N2415/00		
FI分类号	G01N33/53.J G01N33/53.S C07K16/14 G01N33/536.A G01N33/02		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA15 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	2001202941 2001-08-02 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：建立一种快速检测牛奶和肉类中常见的β-内酰胺抗生素的方法。本发明对主要的第一代β-内酰胺具有广泛的特异性，并且可以用于测试牛奶和肉等中是否存在残留的β-内酰胺抗生素。

